

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 574 185

②① N° d'enregistrement national :

84 18268

⑤① Int Cl* : G 01 N 33/566; C 07 K 17/00.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30 novembre 1984.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 23 du 6 juin 1986.

⑥① Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦① Demandeur(s) : L. DE WECK Alain. — CH.

⑦② Inventeur(s) : Alain L. De Weck, C. H. Schneider et H. P.
Rolli.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Cabinet Lemoine et Bernagioni.

⑤④ Nouveaux polymères de lysine substitués destinés à servir de supports pour la préparation de produits de diagnostic.

⑤⑦ L'invention concerne de nouveaux polymères de lysine, destinés à servir de supports pour la préparation de réactifs pour diagnostics des allergies hapténiques, dans lesquels les molécules présentent le même nombre de radicaux de L-lysine compris entre 8 et 20.

Les polymères de lysine sont caractérisés en ce qu'ils comportent, après couplage avec les haptènes, des substituants hydrophiles alternant avec des substituants hydrophobes. Les substituants hydrophiles sont constitués par des restes carboxylatoalkyle, tels que le reste acide adipique, ou par des restes oligohydroxy, tels que le reste acide gluconique.

L'invention concerne également des produits de diagnostic pour les tests cutanés destinés à déceler les allergies hapténiques, constitués par les produits de couplage des polymères de lysine avec les haptènes.

Elle concerne encore des produits de diagnostic pour les tests sérologiques, constitués d'un support solide sur lequel ont été fixés les produits de couplage des polymères de lysine avec les haptènes.

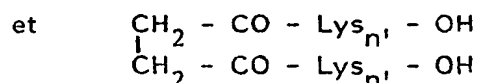
FR 2 574 185 - A1

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention concerne de nouveaux polymères de lysine destinés à être utilisés comme supports pour la préparation de réactifs pour diagnostics des allergies hapténiques.

- 5 Il a été décrit, dans la Demande de Brevet Européen déposée le 6 août 1981 sous le n° 81401267.0 par le Demandeur, des polymères de lysine utilisables comme supports pour la préparation de produits de diagnostic, répondant à l'une des formules suivantes :



- 15 dans lesquelles n est un nombre entier compris entre 8 et 20, et de préférence compris entre 8 et 12 et n' est un nombre entier compris entre 4 et 10 et Lys représente le radical de la L-lysine.

- 20 Ces polymères de lysine se sont montrés être très utiles comme supports pour la préparation de produits de diagnostic dans les tests cutanés destinés à détecter une allergie à la pénicilline ou à tout autre antibiotique du type β - lactame.

- 25 Ces polymères de lysine se sont avérés toutefois mal adaptés à la préparation de réactifs pour diagnostics des allergies hapténiques, lorsque les haptènes qui doivent être couplés sur ces polymères, sont hydrophobes.

- 30 Les polymères en question qui sont totalement substitués par les groupes hapténiques sont, en effet, insolubles en milieu aqueux, lorsque l'on couple à ces polymères des haptènes hydrophobes, et conviennent donc difficilement à des tests cutanés.

- 35 La présente invention vise à surmonter cette difficulté en proposant de nouveaux supports de polylysine partiellement substitués par des substituants hydrophiles et sur lesquels sont couplés les

haptènes hydrophobes.

La présente invention propose donc de nouveaux polymères de lysine qui, après couplage avec les haptènes hydrophobes, comportent en alternance des groupes hydrophiles et des groupes hydrophobes.

La présente invention concerne également les produits de couplage des polymères de lysine avec les haptènes.

Elle a également pour objet l'application de ces produits de couplage à la préparation de réactifs pour diagnostics des allergies hapténiques.

La présence combinée de substituants hydrophiles et de substituants hydrophobes sur la chaîne d'oligolysine permet de notablement améliorer la solubilité du support de polylysine dans l'eau et rend ledit support particulièrement approprié pour déceler les allergies hapténiques dans les tests cutanés.

Si l'utilisation des nouveaux polymères de lysine substitués conformes à l'invention présente un intérêt tout particulier pour la détection des allergies hapténiques dans les tests cutanés, leur utilisation n'est pas limitée à ces seuls tests.

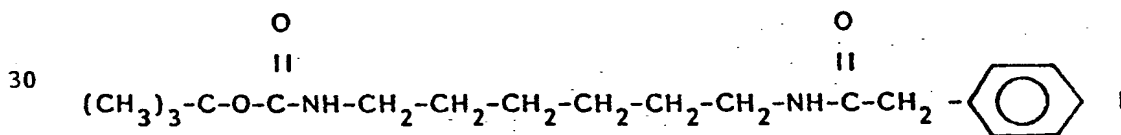
De récentes études effectuées par le Demandeur ont montré que les polymères de lysine conformes à l'invention pouvaient être également utilisés pour la détection des allergies dans les tests sérologiques en couplant lesdits polymères à un support.

Le Demandeur a pu constater que la présence des groupes hydrophiles sur le polymère de lysine n'affectait en rien l'efficacité du polymère à déceler les allergies hapténiques et que les polymères conformes à la présente invention se comparaient avantageusement aux polymères de lysine décrits dans la Demande de Brevet Européen précitée.

Les substituants hydrophiles utilisés sont avantageusement constitués par des substituants du type carboxylatoalkyle ou par des oligohydroxy.

5 La préparation des oligolysines conformes à l'invention qui doivent être substituées par des groupes polaires et plus particulièrement par des restes du type carboxylatoalkyle ou des oligohydroxy et des groupes hapténiques hydrophobes, nécessite que soient protégées les chaînes latérales de la chaîne d'oligolysine par des
10 groupes protecteurs différents susceptibles d'être éliminés sélectivement. Après élimination du premier type de groupes protecteurs, les haptènes (par exemple) peuvent être fixés sur les groupes amino libérés. Dans une étape subséquente du procédé, les groupes amino encore protégés sont débloqués pour permettre la
15 fixation des groupes polaires. On utilise avantageusement comme groupes protecteurs des chaînes latérales les groupes tert-butyloxycarbonyl Boc- et le groupe benzyloxycarbonyl Z-. Le groupe Boc peut être éliminé par acidolyse par exemple par l'acide trifluoroacétique, tandis que le groupe Z- peut être éliminé par
20 hydrogénéolyse catalytique.

Dans le cas où l'on utilise des substituants hydrophiles du type oligohydroxy, il est en général avantageux d'introduire ces substituants en dernier, c'est-à-dire après couplage de la chaîne
25 d'oligolysine avec les haptènes. Ceci peut être illustré par exemple sur le modèle monomère N¹ - Boc - N⁶ - phénylacétyl - diaminohexane (I) :



Dans cet exemple, le phénylacétyl représente l'haptène à fixer et le diaminohexane représente le monomère lysine. Après
35 élimination du groupe protecteur Boc, on fait réagir la lactone de l'acide gluconique pour obtenir le N¹-gluconyl -N⁶-phénylacétyl

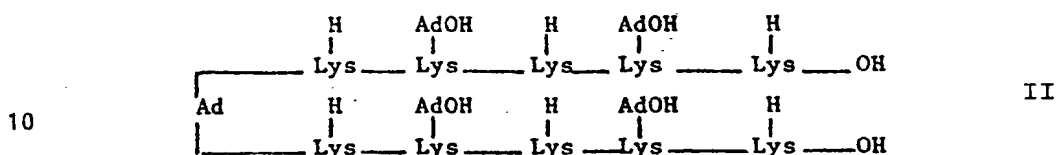
diaminohexane.

Dans le cas des substituants hydrophiles du type carboxylatoalkyle, il est avantageux d'introduire la lysine comportant le
5 reste carboxylatoalkyle convenablement protégé dans la chaîne d'oligolysine. La polylysine comportant les groupes hydrophiles obtenue à l'étape finale du procédé, et qui est totalement protégée, est débloquée de telle sorte que les fonctions carboxylique et amino soient libérées simultanément. Le support de polymère de lysine totalement
10 déprotégé peut alors être substitué par les groupes hapténiques hydrophobes en couplant audit support les haptènes préalablement activés en les mettant sous forme d'ester, éventuellement en présence d'un agent de condensation.

15 Le procédé de préparation des polymères de lysine conformes à l'invention comportant des groupes carboxylatoalkyle comme substituants hydrophiles comprend la série d'étapes suivantes :

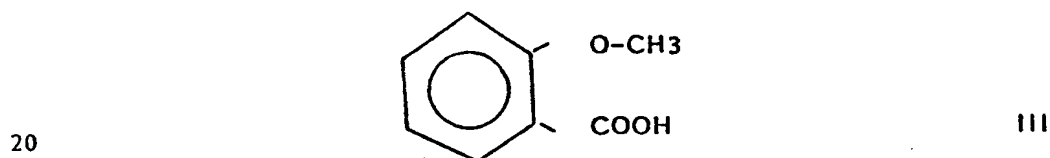
- 20 - dans une première étape, on couple un dérivé de la lysine dont la fonction carboxylique est protégée, avec un dérivé de la lysine dont l'azote terminal est protégé et dont la fonction carboxylique est activée, ledit dérivé comportant le reste carboxylatoalkyle convenablement protégé que l'on désire introduire dans la chaîne d'oligolysine,
- 25 - dans chacune des étapes successives suivantes, on couple la chaîne d'oligolysine obtenue dans l'étape précédente et après déprotection de l'azote terminal, alternativement avec un dérivé de la lysine convenablement protégé et activé tel que celui utilisé dans la première étape, mais ne
30 comportant pas de reste carboxylatoalkyle, et avec un dérivé de la lysine tel que celui utilisé dans la première étape comportant un reste carboxylatoalkyle,
- 35 - dans une étape finale, et avant couplage avec les haptènes, on déprotège simultanément les fonctions amino et carboxylique.

Il sera décrit, ci-après, à titre d'exemple, la synthèse de l'hétéromère déca-L-lysine (PAL 5+5), constitué de deux chaînes pentalysine reliées ensemble par l'intermédiaire de leur azote terminal par un pont acide adipique, substitué par des restes carboxylatopentanoyle sur quatre des groupes amino de la chaîne d'oligolysine (II), et répondant à la formule :



où Ad désigne le reste acide adipique $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$.

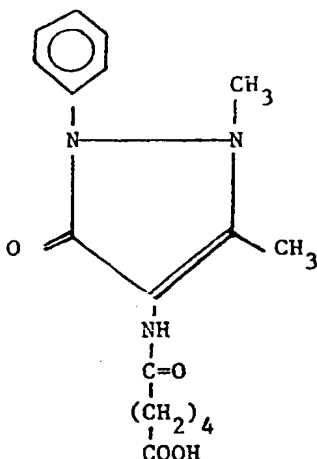
15 Comme exemple de fixation d'un haptène hydrophobe sur le PAL 5+5, on décrira le couplage de l'acide o-méthoxybenzoïque (III) :



L'acide o-méthoxybenzoïque est un analogue de l'acide acétylsalicylique, mais présente une plus grande stabilité que l'haptène acétylsalicylique. L'acide o-méthoxybenzoïque a été transformé en l'ester de N-hydroxysuccinimide par une méthode connue en soi et a été ajouté sous forme de solution de tétrahydrofurane avec environ deux fois la quantité stoechiométrique au support PAL 5+5 dans une solution aqueuse de carbonate de potassium. Le couplage s'est effectué en phase homogène et le produit de couplage qui avait une réaction négative avec la ninhydrine, a présenté les propriétés spectrales attendues. Le produit était totalement substitué sur les six restes de la L-lysine non substitués par l'acide adipique et présentait une solubilité dans l'eau appropriée pour les test cutanés.

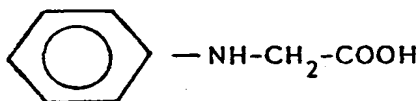
35 Comme autres exemples de fixation d'un haptène hydrophobe sur le PAL 5+5, on décrira également le couplage de la

carboxylatovaléroyl-aminoantipyrine de formule :



IV

et le couplage de la D- α - phénylglycine :



V

(désignée dans la suite du texte par l'abréviation D- α -Phg).

La carboxylatovaléroyl-aminoantipyrine (IV) et la D- α -phénylglycine (V) ont été activées préalablement à la réaction avec PAL 5+5, par transformation en ester de 4-hydroxysuccinimide, et ont été ajoutées sous forme de solution de tétrahydrofurane au support PAL 5+5 dans une solution aqueuse de carbonate de potassium.

La synthèse du PAL 5+5 a été réalisée en utilisant le procédé de purification à deux phases, tel que décrit par Schneider et al. dans J. Peptide Protein Res. 15, 411-419 (1980) et par Rolli et Schneider dans Chimia 35, 403-405 (1982).

Les extractions ont été effectuées en utilisant la technique décrite par Schneider et al. dans Int. J. Peptide Protein Res. 15, 411-419 (1980).

Le contrôle analytique des produits a été effectué par

chromatographie sur couche mince (TLC) (Rolli et al., Int. J. Peptide Protein Res. 15, 339-410 (1980)). Le système A est un mélange chloroforme/méthanol 9:1. L'électrophorèse sous haute tension sur couche mince (HVTLE) a été réalisée à l'aide d'un Phérogaphe
5 Francfort, Mini 68 ou d'un appareil Camag.

Les abréviations utilisées dans la suite du texte sont celles recommandées par la Commission IUPAC-IUB sur la nomenclature Biochimique publiée dans Biochemistry 11, 1726-1732 (1972) :

10

	Lys	=	L-lysine
	Ala	=	alanine
	Boc	=	tert-butyloxycarbonyl
	-ONBzl	=	nitrobenzyloxy - ester de p-nitrobenzyle
15	OBzl	=	ester de benzyle
	OSu	=	ester de N-hydroxysuccinimide
	Z-	=	benzyloxycarbonyl
	Nps	=	p-nitrophénylsulfényle
	DOC	=	dicyclohexylcarbodiimide
20	HOBt	=	1-hydroxybenzotriazole
	DMF	=	diméthylformamide
	THF	=	tétrahydrofuranne
	TFA	=	acide trifluoroacétique
	DCHA	=	dicyclohexylamine
25	DMSO	=	diméthylsulfoxyde

Appliqués à la détection des allergies hapténiques dans les tests cutanés, les polymères de lysine substitués conformes à l'invention, après couplage avec les haptènes, sont utilisés tels quels, généralement sous forme de solutions ou suspensions réalisées dans une
30 phase aqueuse, de préférence saline. Lorsqu'on utilise les polymères de lysine conformes à l'invention pour la détection des allergies hapténiques dans les tests sérologiques, ces polymères sont couplés à un support solide, généralement un polymère insoluble, tel que
35 cellulose, sépharose et se présentant sous la forme de billes, de disque ou de tube.

On utilise avantageusement comme support solide insoluble un gel d'agarose préalablement activé par mise sous la forme ester, tel que l'ester succinimide et auquel on lie de façon covalente le polymère de lysine conforme à l'invention, par l'intermédiaire d'un groupe amino libre que comporte ledit polymère.

La présence combinée de groupes hydrophiles et de groupes hydrophobes, outre le fait qu'elle permet d'accroître la solubilité dans l'eau du conjugué haptène-polymère de lysine, confère à celui-ci un certain nombre de particularités mises à profit dans les tests sérologiques.

Cette alternance de groupes hydrophiles et de groupes hydrophobes, tout en favorisant le caractère hydrophile du polymère de lysine, est également favorable à une bonne interaction antigène-anticorps en milieu aqueux. La molécule haptène-polylysine substituée à une charge neutre qui prévient les réactions non spécifiques entre immunoglobulines et support fixe, ce qui a pour effet de diminuer le bruit de fond non spécifique lors d'un dosage radioimmunologique. Le fait, enfin, de disposer d'un antigène plurivalent présentant plusieurs déterminants antigéniques dont la structure moléculaire n'est pas modifiée par le milieu réactionnel, permet une totale interaction entre les antigènes et les anticorps à détecter, ce qui est d'un grand intérêt du point de vue sérologique.

Les exemples I et II donnés, ci-après, à titre non limitatif, illustrent respectivement la préparation d'un dérivé monomère substitué par un groupe oligohydroxy et la préparation du PAL 5+5 et son couplage avec divers haptènes. L'ensemble des opérations que comporte la préparation du support PAL 5+5 et son couplage avec un haptène est schématisé à la page 7.

L'exemple III illustre l'utilisation d'un conjugué benzylpenicilloyl-PAL 5+5 couplé à un support solide pour la détection d'anticorps anti-benzylpenicilloyl (BPO) dans les tests sérologiques.

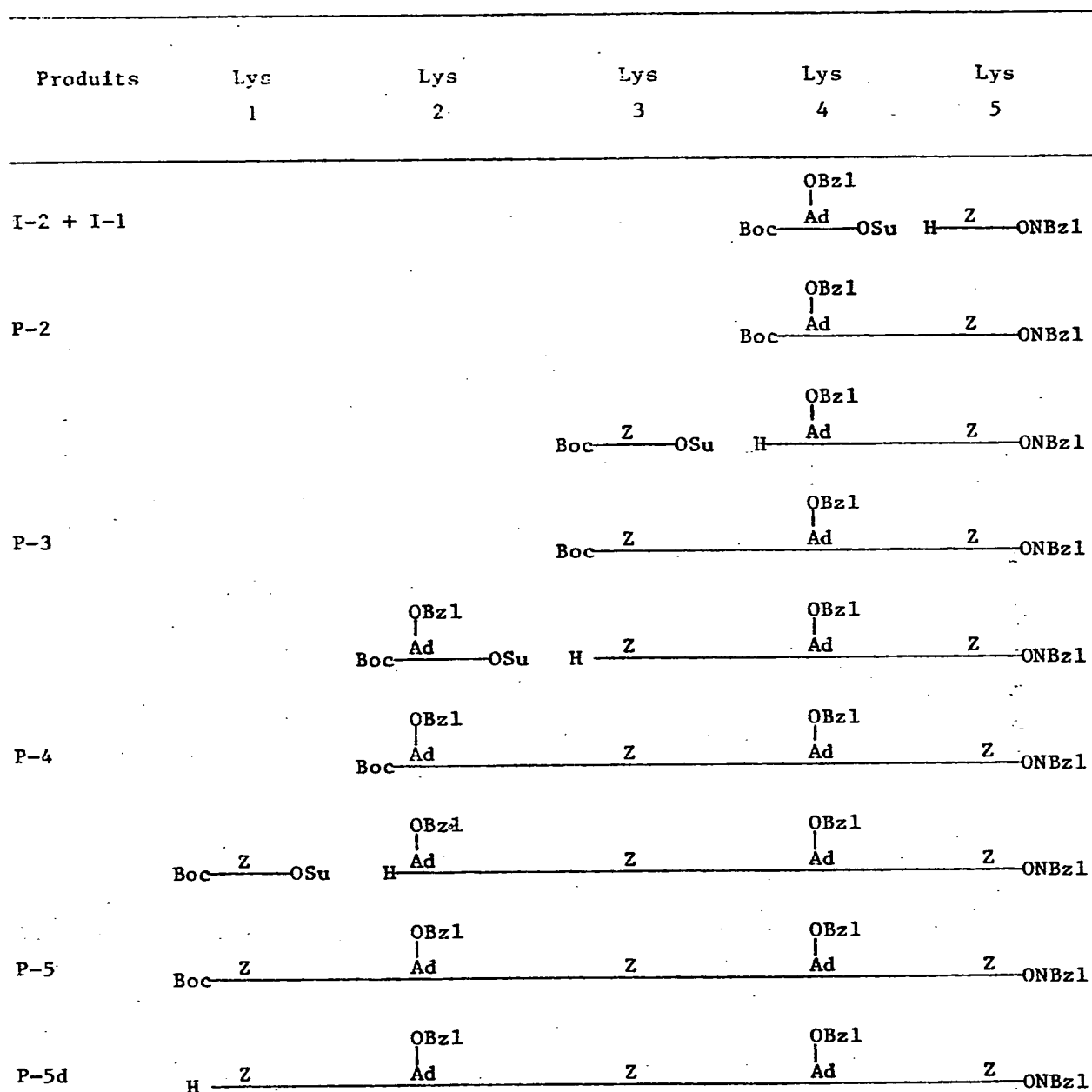
EXEMPLE I :N¹ -Boc-N⁶-phénylacétyl-1,6-diaminohexane

5 On a mélangé 545 mg (4 mmoles) d'acide phénylacétique et
600 mg (4 mmoles) de 1-hydroxybenzotriazole (90%) dissous dans 15 ml
de THF avec 908 mg (4,4 mmoles) de DOC à 5°C et on a agité à cette
température pendant 1 heure. On a ajouté à cette solution 1,01 g (4
10 mmoles) de chlorhydrate de N¹-Boc-1,6-diaminohexane et de la
triéthylamine jusqu'à pH 7. Après 1 heure, on a séparé le précipité
par filtration et on a repris le filtrat à sec sous vide à 40°C. On a
dissous le résidu (2,7 g) dans 100 ml d'acétate d'éthyle et extrait six
fois avec des portions de 50 ml de K₂CO₃ 2M puis HCl 0,1 M et on a
15 finalement lavé à l'eau jusqu'à neutralité. On a séché la solution sur
du Na₂SO₄ et on a éliminé le solvant sous vide : on a obtenu 24 g de
résidu amorphe. TLC : R_f 0,94, homogène (1,4-dioxanne/H₂O 5:1), R_f
0,47, homogène (CHCl₃/CH₃OH 9:1).

N¹ -Gluconyl-N⁶-phénylacétyl-1,6-diaminohexane

20 On a maintenu 636 mg (1,9 mmole) de N¹-Boc-N⁶-phénylacétyl-
-1,6-diaminohexane dans 10 ml d'acide trifluoroacétique refroidi dans
de la glace pendant 1 heure. Après élimination de l'acide sous vide, on
a dissous l'huile résiduelle dans 3 ml de THF/H₂O (1:2) et neutralisé à
25 froid avec de la triéthylamine. On a ajouté à cette solution 400 mg
(2,2 mmoles) de δ-lactone de l'acide D(+)-gluconique (Fluka, Buchs)
dissous dans 1 ml d'eau et on a ajusté le pH à 9 avec de la
triéthylamine. Après 12 heures, on a ajouté une portion supplémentaire
de 400 mg de la lactone de l'acide gluconique et on a recueilli, après
30 24 heures, le produit par filtration après acidification de la solution
réactionnelle à pH 2 avec HCl 2M. Le produit brut (265 mg) a été
recristallisé dans le mélange éthanol/isopropanol (1:1) pour donner
160 mg, p. f. 180-183°C.
TLC : R_f 0,81, homogène (1,4-dioxanne/H₂O, 5:1). IR (KBr) :
35 3 300 br. (OH), 2 920 (CH, -CH₂-), 2 850 (CH, -CH₂-), 1 635 (C=O,
amide), 1 545 (NH, O=C-N), 1 445 (aromatique), 1 430 (OH, alcool)

Schéma de la synthèse du PAL 5+5 (II)



2 P-5d + acide adipique $\xrightarrow[\text{1-hydroxybenzotriazole}]{\text{dicyclohexylcarbodiimide}}$ PAL 5+5

PAL 5+5 $\xleftarrow[\text{hydrogénolyse / Pd sur C}]{\text{protégé}}$

primaire), 1 210 (OH, alcool secondaire).

Analyse élémentaire :

$C_{20}H_{32}N_2O_7$ (412,48),	calculé C 58,24	H 7,82	N 6,79 %
	trouvé C 58,41	H 7,54	N 6,72 %

5

EXEMPLE II :

Synthèse du PAL 5+5

10 H-Lys (Z) -ONBzl (I-1)

On a agité 7,4 g (12 mmoles) du sel Nps-Lys (Z) DCHA et 2,6 g (12 mmoles) de bromure de 4-nitrobenzyle dissous dans 50 ml de DMF à la température ambiante, après addition de 1,3 ml (12 mmoles) de N-méthylmorpholine. On a dilué la solution réactionnelle avec un excès de CH_2Cl_2 et extrait avec HCl 0,1 M, H_2O , K_2CO_3 0,3 M et à nouveau avec de l'eau. L'évaporation du solvant sous vide a laissé une huile jaune qui a été reprise dans 160 ml de méthanol et agitée, pour éliminer Nps, dans l'obscurité pendant 30 min avec 20 ml d'acide acétique glacial et 200 ml de $Na_2S_2O_3$ 1 M. On a séparé par filtration le précipité jaune de Nps-disulfure, et on a dilué le filtrat jusqu'à 400 ml avec CH_2Cl_2 pour extraction avec de l'eau, K_2CO_3 0,15 M et H_2O . L'élimination du solvant et le séchage sous vide ont laissé : 3,9 g (9,3 mmoles) d'une masse cristalline jaunâtre. TLC : R_f 0,38, 25 tache principale, traces à R_f 0,27 et 0,81 (Nps-disulfure) (système A).

Ester de 1-benzyl-6-N-hydroxysuccinimide de l'acide adipique

30 On a dissous 14,6 g (100 mmoles) d'acide adipique et 5,4 g (50 mmoles) d'alcool benzylique dans 70 ml de DMF, puis on a agité pendant 90 min à la température ambiante avec 11,3 g (55 mmoles) de DCC et 150 mg de 4-diméthylaminopyridine. On a séparé par filtration le précipité d'urée et on a dilué le filtrat jusqu'à 400 ml avec CH_2Cl_2 35 pour l'extraction avec HCl 0,1 M et H_2O . On a éliminé le solvant sous vide et on a repris le résidu dans 300 ml d'acétate d'éthyle et extrait 3

fois avec 100 ml de K_2CO_3 0,15 M. On a lavé les extraits réunis avec de l'acétate d'éthyle et acidifié avec HCl 2M à pH 3,5. On a extrait l'émulsion résultante 3 fois avec 150 ml de CH_2Cl_2 . On a repris l'extrait à sec sous vide et on a chromatographié le résidu brut
5 (8,6 g) sur une colonne de gel de silice (100 g de gel de silice 60) avec $CHCl_3$ /méthanol (9:1). Rendement: 7,0 g (30 mmoles) de l'ester monobenzyle de l'acide adipique sous forme d'une huile. TLC : R_f 0,50, homogène (A). On a mélangé ce produit dissous dans 50 ml de DMF avec 3,7 g (32 mmoles) de DCC et agité à la température ambiante
10 pendant 22 heures. On a obtenu par extraction 10,0 g (30 mmoles) d'une huile légèrement jaune. TLC : R_f 0,84, tache principale, trace à R_f 0,93 (A).

Boc-Lys(Ad(OBzl))-OSu (1-2)

15 On a agité 10 g d'ester de 1-benzyl-6N-hydroxy-succinimide et 7,4 g (30 mmoles) de Boc-Lys dissous dans 50 ml de DMF, à la température ambiante pendant 18 heures après avoir ajusté le pH à 8 avec de la N-méthylmorpholine. Il s'est formé un léger trouble qui a
20 pu être dissipé en ajoutant 10 ml de DMSO. On a filtré le mélange réactionnel, dilué le filtrat avec CH_2Cl_2 jusqu'à 400 ml et extrait avec HCl 0,1 M et H_2O . On a éliminé sous vide la phase organique et on a repris le résidu dans 300 ml d'acétate d'éthyle et extrait 3 fois avec
25 100 ml de K_2CO_3 0,15 M. On a acidifié l'extrait à pH 3,5 avec HCl 2M et on a extrait le produit avec du CH_2Cl_2 (3 fois 100 ml). On a finalement lavé la solution de CH_2Cl_2 avec HCl 0,1 M et H_2O . L'élimination du solvant et le séchage sous vide ont laissé 10,8 g (23 mmoles) de Boc-Lys (Ad(OBzl)) sous la forme d'une huile jaunâtre.
30 On a dissous celle-ci dans 100 ml de DMF et mélangé à froid à 2,6 g (23 mmoles) de HOBt et 5,2 g (excès de 10 %) de DCC. Après avoir laissé la solution 1 heure à 0°C et 16 heures à la température ambiante, on a filtré celle-ci et, après dilution avec CH_2Cl_2 , on a isolé le produit par extraction : on a obtenu 12,6 g (22 mmoles) d'une
35 masse incolore, visqueuse. TLC : R_f 0,59, tache principale, traces de produits secondaires (A).

Boc-Lys(Z)-Lys(Ad(OBzl))-Lys(Z)-Lys(Ad(OBzl))-Lys(Z)-ONBzl (P-5)

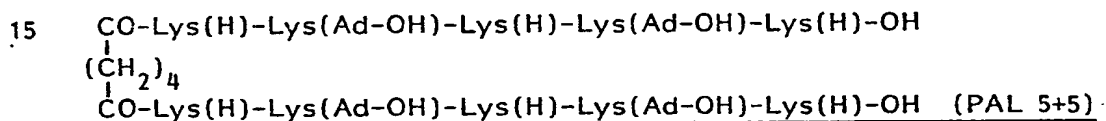
Partant de 3,9 g (9,3 mmoles) de H-Lys (Z)-ONBzl, on a obtenu le peptide P-5 en couplant étape par étape, à la température ambiante à la séquence dont l'azote terminal a été préalablement débloqué, respectivement 9,3 mmoles de 1-2 (volume réactionnel : 100 ml, CH₂Cl₂), 6,3 mmoles de Boc-Lys(Z)-OSu (50 ml, CH₂Cl₂), 5,8 mmoles de 1-2 (50 ml, DMF), 5,2 mmoles de Boc-Lys(Z)-OSu (50 ml, DMF). Ces quantités étaient équimoléculaires ou en excès de 5 % par rapport au peptide. Les durées réactionnelles étaient respectivement de 2, 20, 20 et 60 heures, le pH était de 8, et était ajusté pour chaque réaction avec la triéthylamine. Les esters d'hydroxysuccinimide n'ayant pas réagi restant à la fin des réactions, étaient transformés en dérivés extractibles avec les acides, par réaction avec la 2-diéthylaminoéthylamine. Le traitement des intermédiaires protégés P-2, P-3, P-4 s'est effectué par dilution des solutions réactionnelles avec un excès de CH₂Cl₂ et extraction avec HCl 0,1 M, H₂O, K₂CO₃ 0,3 M et H₂O. On a effectué les déprotections de l'azote terminal des intermédiaires P-2, P-3 et P-4 en dissolvant les peptides dans 50 ml d'acide trifluoroacétique aqueux à la température ambiante. Après 40 min, on a éliminé l'acide sous vide et on a dissous les huiles résiduelles dans 400 ml de CH₂Cl₂ et extrait avec H₂O, K₂CO₃ 0,15 M et H₂O dans une colonne d'extraction. On a alors éliminé sous vide les solvants. On a suivi toutes les étapes réactionnelles par TLC suivant la technique décrite par Rolli et al. dans Int. J. Peptide Protein Res. 15, 339-410 (1980). Le traitement de l'intermédiaire P-5 a dû être modifié, car il s'est formé une émulsion relativement stable de la phase aqueuse lors de l'extraction basique. On a pu éliminer en partie la phase organique et on a soumis l'émulsion à une évaporation sous vide à 40°C, ce qui a fourni un précipité du produit. On a repris celui-ci et le résidu provenant de la phase organique, après élimination du solvant sous vide, dans 100 ml de DMF. On a filtré et on a ajouté goutte à goutte au filtrat 1,5 litre d'eau sous agitation. On a recueilli le précipité de P-5 par filtration, on l'a lavé à l'eau et séché sous vide : on a obtenu 8,3 g (4,8 mmoles), d'une poudre pratiquement

blanche. TLC : R_f 0,57 tache principale, traces de produits secondaires (A).

H-Lys(Z)-Lys(Ad(OBzl))-Lys(Z)-Lys(Ad(OBzl))-Lys(Z)-ONBzl (P-5d)

5

On a débloquent 8,3 g de P-5 dans le TFA, comme il a été décrit pour P-2-4. Lors de l'extraction de la solution de CH_2Cl_2 avec de l'eau, il s'est formé un gel et une émulsion. On a concentré le mélange sous vide jusqu'à ce que la majeure partie du produit ait précipité. Il a été recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché sous vide : on a obtenu un résidu de 7,8 g. TLC : R_f 0,71, tache principale, des traces de produits secondaires (1,4-dioxane/ H_2O , 9:1).



On a mélangé 7,8 g (4,8 mmoles) de peptide P-5d et 330 mg (2,3 mmoles) d'acide adipique dans 30 ml de DMF avec 750 mg (5 mmoles) de HOBt et 1,0 g (10 % d'excès) de chlorhydrate de N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide. Le pH a été amené à 8 avec la N-méthylmorpholine. Après agitation pendant 20 heures à la température ambiante, on a dilué la pâte avec 20 ml de DMF et on l'a ajoutée à 1 litre de HCl 0,01 M sous agitation. On a recueilli le précipité par filtration, on l'a lavé à l'eau et séché sous vide : on a obtenu 7,8 g (2,3 mmoles, 96 %) de PAL 5+5 protégé, sous la forme d'un granulé légèrement jaunâtre. Celui-ci a été hydrogéné pendant 5 heures 1/2 dans 100 ml d'acide acétique glacial en présence de 700 mg de Pd sur du carbone (10 % Pd). On a séparé le catalyseur par filtration et le filtrat a été évaporé sous vide. On a dissous le résidu dans 100 ml H_2O , on l'a extrait avec de l'éther et concentré sous vide jusqu'à 15 ml et on l'a passé au travers d'une colonne de Sephadex G-10 de 2,5 x 44 cm avec de l'eau. On a réuni les fractions contenant le produit désalifié et on a passé une portion aliquote de 50 % de

l'ensemble (40 ml) au travers d'une colonne de Sephadex CM-C-25 sous forme Na^+ de 2,5 x 29 cm à une vitesse de 60 ml/heure, des fractions de 3,5 ml étant recueillies. L'éluant était de l'eau jusqu'à la fraction 35 puis un gradient d'une solution NaCl 0-0,3 M. Les fractions 81 à 110 ont été réunies, concentrées sous vide jusqu'à 15 ml et désalifiées sur une colonne de Sephadex G-10 de 2,5 x 73 cm. On a réuni les fractions 60 à 80 provenant de la colonne échangeuse d'ions, comme on l'a indiqué ci-dessus, et à nouveau chromatographié sur une colonne de Sephadex-CM, comme indiqué plus haut, avec cette différence que l'on a utilisé comme éluant un gradient NaCl 0-0,15 M. Une désalification et une lyophilisation comme pour la fraction I ont donné 0,45 g de fraction II. Les fractions I et II se sont montrées être identiques par HVTLE et ont été ultérieurement réunies.

HVTLE : 16,5 mm vers la cathode, homogène (50 volts/cm, pyridine/acide acétique/ H_2O , 1:9:90, pH 3,6, 10 min, plaque KG 60 F 254 Merck) ; 49,5 mm vers la cathode, homogène (50 Volts/cm, pyridine/acide acétique/ H_2O , 1:9:90, pH 3,6, 20 min, plaque de cellulose F, Merck).

Analyse des aminoacides après réaction d'une portion aliquote (100 mg) avec un excès de Boc-Ala-OSu (280 mg) dans 4 ml de K_2CO_3 0,25 M contenant 50 % de THF pendant 6 heures et élimination du groupe protecteur Boc avec TFA.

Lys₁₀Ala₆ trouvé

Analyse élémentaire : $\text{C}_{90}\text{H}_{162}\text{N}_{20}\text{O}_{26}$ (1 940,4)

calculé	C 55,71	H 8,41	N 14,44 %
trouvé	C 55,41	H 8,21	N 14,26 %
(corrigé pour 0,81 % cendres)			

30 Hexa-(o-méthoxybenzoyl)-PAL 5+5

On a mélangé 65 mg (33,5 mmoles) de PAL 5+5 dans 1 ml de K_2CO_3 1 M avec 100 mg (0,4 mmole) de l'ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 2-méthoxybenzoïque dans 1 ml de THF, préparé à partir de l'acide 2-méthoxybenzoïque et de N-hydroxysuccinimide avec le chlorhydrate de N-éthyl-N'-(3-diméthylami-

nopropyl)-carbodiimide. On a agité la solution qui était légèrement trouble, à la température ambiante pendant 16 heures, on a neutralisé avec HCl 1 M et on a repris à sec sous vide. On a dissous le résidu dans approximativement 4 ml d'eau et on a passé la solution au travers d'une colonne de Sephadex-G-25 de 2,8 x 50 cm avec de l'eau. On a réuni les fractions contenant le produit du pic de tête et on a concentré et lyophilisé l'ensemble : on a obtenu 55,5 mg (60,5 %) de produit. Extinction molaire E_m^{280} (H₂O) : 14 500, par groupe o-méthoxybenzoyle seul : 2 420 - Littér. (Handbook of Chemistry & Physics, R.C. Weast & M.J. Astle, ed., page C-195, CRC Press, West Palm Beach, Fl., 1974) acide o-méthoxybenzoïque : 2 510.

Phénazone - PAL 5+5

On a agité 1,5 g (4,5 mmoles) de carboxylatovalérylaminoantipyrine (IV) et 0,575 g (5 mmoles) de N-hydroxysuccinimide dans 30 ml de DMF avec 5 mmoles de chlorhydrate de N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide pendant 16 h à la température ambiante, en maintenant le pH légèrement alcalin avec de la triéthylamine. On a dilué la suspension avec 100 ml CH₂Cl₂ et extrait avec HCl 0,1 M, H₂O, 2 % K₂CO₃ et à nouveau avec H₂O, en utilisant pour chaque extraction un volume de 300 ml. On a séché la phase organique (Na₂SO₄) et on l'a évaporée sous vide. On a obtenu un résidu qui a été recristallisé dans CH₂Cl₂ : 1,2 g (62 %), p.f. 197-199°C. TLC (CHCl₃/MeOH, 9:1), R_f : 0,30 ; (dioxane/H₂), R_f : 0,64, homogène.

300 mg (70 mmoles) de l'ester d'hydroxysuccinimide de (IV) ont été mis en suspension dans 4 ml de THF ; la suspension a été ajoutée à 200 mg PAL 5+5 dans 4 ml 1 % K₂CO₃ puis le pH a été ajusté à 10 avec NaOH 1 N. Après 1 h, on a ajouté à nouveau 150 mg d'ester activé sous forme de poudre. Après 17 h à la température ambiante, on a éliminé sous vide THF et on a neutralisé la solution aqueuse avec HCl 1 N. On a fait passer la solution au travers d'une colonne 2,5 x 70 cm de Sephadex G25 avec une solution salée 0,01 M tamponnée au phosphate ayant un pH de 7,4 et l'éluat qui contenait le produit de couplage a été à nouveau passé sur une colonne de Sephadex G25 avec

de l'eau. Les fractions contenant le produit de couplage, repérées à 260 nm, ont été réunies et lyophilisées : on a obtenu 270 mg (66 %) du produit de couplage. TLC (n-butanol/H₂O/HAc/triéthylamine, 10:10:9:1), R_f: 0,30; (CHCl₃/MeOH/17 % NH₃, 5:5:2), R_f : 0,69, 5 homogène.

Analyse élémentaire de l'acide libre, obtenu après précipitation avec HCl 0,5 N et séchage :

10 $C_{192}H_{276}N_{38}O_{44}$ (3 820,6) calculé C 60,36 H 7,28 N 13,93 %
trouvé C 60,23 H 7,51 N 13,87 %

D - α - Phénylglycyl - glycyl - PAL 5+5 (chaîne latérale de l'ampicilline)

15 23 mg (57 μmoles) de Boc -D -α - Phg - Gly - OSu dans 0,5 ml de THF ont été ajoutés à 40 mg PAL 5+5 dans 1,0 ml K₂CO₃ 1 M. Le mélange à deux phases a été agité pendant 48 h à la température ambiante. Après la première heure, on a ajouté à nouveau 35 mg de l'ester activé. On a éliminé les solvants sous vide, et on a 20 laissé le résidu dans l'acide trifluoroacétique à la température ambiante pendant 40 min. Après avoir éliminé l'acide sous vide, on a trituré le résidu et on l'a lavé avec de l'éther. On l'a dissous ensuite dans un faible volume d'eau et on l'a fait passer au travers d'une colonne 2,5 x 70 cm de Sephadex G25 avec une solution salée 0,01 M tamponnée au 25 phosphate. On a fait à nouveau passer le produit de couplage, repéré à 257 nm, au travers d'une colonne de Sephadex G10 avec de l'eau. On a réuni les fractions contenant le produit de couplage et on les a lyophilisées : on a obtenu 55 mg (80 %) de produit de couplage TLC (n- butanol/H₂O/HAc/pyridine, 10:10:9:1), R_f: 0,83, homogène. 30 Electrophorèse (cellulose F, Merck ; tampon pyridine-acétate pH 3,6 ; 50 volts : cm ; 30 min) : 49 mm vers la cathode, homogène.

Analyse par spectrométrie UV : nombre de groupes D-α-Phg :
calculé: 6,0; trouvé: 5,9; extinction molaire $E_m^{257nm} = 210 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
35 pour D - α - Phg - OH.

EXEMPLE III :Préparation du conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5

5 Dans un premier temps, on a préparé le conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5.

Le conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5 comportait un groupe amino primaire libre, de manière à permettre la fixation par une liaison
10 covalente au support en phase solide.

Fixation du conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5 sur le CH-Sépharose
4 B

15 Le support était constitué par du CH-Sépharose 4 B (gel d'agarose commercialisé par PHARMACIA) que l'on a activé par mise sous la forme d'ester succinimide.

Le conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5 a été couplé aux
20 particules de Sépharose, de telle manière qu'il y ait équivalence entre groupes BPO et unité de phase solide.

Les groupes esters actifs n'ayant pas réagi ont été bloqués avec de l'éthanolamine et les billes de Sépharose ont été conservées
25 dans une solution tampon phosphate contenant de l'albumine de sérum de boeuf.

Tests sérologiques

30 On a utilisé un mélange de sérums cordonaux et de sérums AB comme témoins négatifs, et trois sérums ayant réagi positivement aux tests sérologiques, provenant de patients allergiques à la pénicilline.

35 Les tests ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- lavage et remise en suspension des billes de Sépharose dans 0,01 M - NaHCO_3
- répartition en fractions aliquotes de 100 μl dans des tubes à essais en plastique
- 5 - incubation avec 50 μl de sérum pendant une nuit
- lavage et centrifugation (quatre fois)
- incubation avec 50 μl d'anti-IgE marquée à ^{125}I (environ 50 000 coups/minute) pendant une nuit
- lavage et centrifugation (quatre fois)
- 10 - mesure au compteur gamma.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

15

20	Coups/minute	Bruit de fond	Sérum cordonal AB	355 498
		Patients	R.E.	13 498
			S.D.	11 053
			M.G.	7 526
25	Coups/minute % du total coups/minute (total coups/ minute) 56 285	Bruit de fond	Sérum cordonal Sérum AB	0,63 0,88
Patients		R.E.	24,00	
		S.D.	19,60	
		M.G.	13,40	
30				

35

Ces résultats montrent que le conjugué benzylpénicilloyl - PAL 5+5 couplé à un support solide permet, par un test

radioimmunologique, de détecter immédiatement une allergie à la pénicilline. Les coups/minute élevés obtenus avec les sérums de patients allergiques (13 500) montrent qu'il y a totale réaction entre les anticorps anti-benzylpénicilloyl (BPO) contenus dans le sérum des patients et les antigènes. On constate, par ailleurs, un bruit de fond très faible avec les sérums témoins négatifs, ce qui montre l'absence de réactions non spécifiques entre immunoglobulines et support.

5

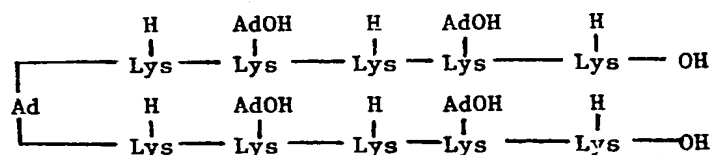
REVENDECATIONS

1. Nouveaux polymères de lysine, destinés à servir de supports pour la préparation de réactifs pour diagnostics des allergies hapténiques, dans lesquels les molécules présentent le même nombre de radicaux de L-lysine compris entre 8 et 20, caractérisés en ce que lesdits polymères, après couplage avec les haptènes, comportent des substituants hydrophiles alternant avec les substituants hapténiques hydrophobes.
2. Nouveaux polymères de lysine selon la revendication 1, caractérisés en ce que les substituants hydrophiles sont constitués par des restes carboxylatoalkyle.
3. Nouveaux polymères de lysine selon la revendication 1, caractérisés en ce que les substituants hydrophiles sont constitués par des restes oligohydroxy.
4. Nouveaux polymères de lysine selon la revendication 2, caractérisés en ce que le substituant hydrophile est le reste acide adipique.
5. Nouveaux polymères de lysine selon la revendication 3, caractérisés en ce que le substituant hydrophile est le reste acide gluconique.
6. Produits de diagnostic pour les tests cutanés destinés à déceler les allergies hapténiques, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les produits de couplage des polymères selon l'une des revendications 1 à 5 avec les haptènes.
7. Produits de diagnostic pour les tests sérologiques destinés à déceler les allergies hapténiques, caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'un support solide sur lequel ont été fixés les produits de couplage des polymères selon l'une des revendications 1 à 5 avec les haptènes.

8. Procédé de préparation des polymères de lysine selon les revendications 1,2 et 4 par élongation progressive d'une chaîne d'oligolysine à partir d'un dérivé de la lysine dont la fonction carboxylique a été préalablement protégée, caractérisé en ce que :

- . dans une première étape, on couple le dérivé de la lysine dont la fonction carboxylique a été préalablement protégée, avec un dérivé de la lysine dont l'azote terminal a été préalablement protégé et la fonction carboxylique activée, ledit dérivé comportant le reste carboxylatoalkyle convenablement protégé à introduire dans la chaîne d'oligomère,
- . dans chacune des étapes successives suivantes, on couple la chaîne d'oligomère obtenue dans l'étape précédente et après déprotection de l'azote terminal, alternativement avec un dérivé de la lysine convenablement protégé et activé tel que celui utilisé dans la première étape, mais ne comportant pas de reste carboxylatoalkyle et avec un dérivé de la lysine convenablement protégé et activé comportant un groupe carboxylatoalkyle tel que celui utilisé dans la première étape,
- . dans une étape finale, et avant couplage avec les haptènes, on libère simultanément les fonctions amino et carboxylique.

9. Procédé de préparation d'un polymère de lysine selon la revendication 8, et répondant à la formule :



dans laquelle Ad signifie le reste acide adipique, caractérisé en ce que :

- . dans une première étape, on couple un dérivé de la lysine dont la fonction carboxylique a été préalablement protégée par un groupe protecteur tel que ONBzl avec un dérivé de

- la lysine dont la fonction amine a été préalablement protégée par un groupe protecteur tel que Boc et la fonction carboxylique activée par mise sous la forme d'ester, ledit dérivé comportant le substituant acide adipique protégé par un groupe protecteur tel que Bzl,
- . dans une étape suivante, on couple la chaîne obtenue dans l'étape précédente, après déprotection de l'azote terminal, avec un dérivé de la lysine dont la fonction amine a été préalablement protégée et la fonction carboxylique activée, tel que celui utilisé dans la première étape, mais ne comportant pas de reste acide adipique,
 - . on répète les opérations effectuées dans les première et seconde étapes,
 - . on condense deux molécules de la chaîne oligomère obtenue dans l'étape précédente avec l'acide adipique, éventuellement en présence d'un agent de condensation,
 - . et on déprotège simultanément les fonctions amino et carboxylique.

10. Procédé de préparation des polymères selon les revendications 8 et 9, caractérisé en ce que le dérivé de lysine convenablement protégé et activé et comportant le reste acide adipique à introduire dans la chaîne d'oligolysine est préparé par réaction de la lysine dont l'azote terminal a été protégé par un groupe protecteur tel que Boc avec un ester de l'acide adipique préalablement protégé par un groupe protecteur tel que OBzl.

11. Procédé de préparation des polymères de lysine selon les revendications 1,3 et 5, caractérisé en ce que la fixation des substituants oligohydroxy sur le polymère intervient après le couplage des haptènes avec ledit polymère.

12. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on couple les polymères selon les revendications 1, 2 et 4 avec les haptènes préalablement activés par mise sous la forme d'esters.

13. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'haptène avec lequel sont couplés les polymères selon les revendications 1, 2 et 4 est l'acide *n*-méthoxybenzoïque.

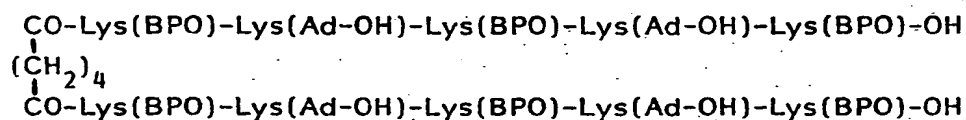
14. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'haptène avec lequel sont couplés les polymères selon les revendications 1, 2 et 4 est la carboxylatovaléryl-aminoantipyrine.

15. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'haptène avec lequel sont couplés les polymères selon les revendications 1, 2 et 4 est la D-phénylglycine.

16. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'haptène avec lequel sont couplés les polymères selon les revendications 1, 2 et 4 est la benzylpénicilline.

17. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'on utilise comme support, un gel d'agarose chimiquement activé et en ce que l'on fixe de façon covalente le produit de couplage du polymère selon les revendications 1, 2 et 4 avec l'haptène.

18. Procédé de préparation des produits de diagnostic selon l'une des revendications 16 et 17, caractérisé en ce que le produit de couplage du polymère selon les revendications 1, 2 et 4 avec l'haptène est lié par l'intermédiaire d'un groupe fonctionnel $-NH_2$ libre au support et qu'il répond à la formule :



dans laquelle Ad signifie le reste acide adipique et BPO le groupement benzylpénicilloyl.